

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15735

研究課題名（和文）創薬研究を見据えた脳オルガノイド誘導法によるDravet症候群病態モデルの作製

研究課題名（英文）Brain organoids as pathological model for Dravet syndrome applicable to drug discovery research

研究代表者

田中 泰圭（TANAKA, Yasuyoshi）

福岡大学・てんかん分子病態研究所・ポスト・ドクター

研究者番号：50714466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においてDravet症候群（DS）患者由来iPS細胞より、FOXG1およびNKX2.1の発現が陽性な神経幹細胞を含む内側基底核原基（medial ganglionic eminence：MGE）領域の脳オルガノイドを作製した。作製した脳オルガノイド内には、parvalbumin陽性な抑制性神経細胞の発現が確認でき、この神経細胞はNav1.1陽性であることも合わせて確認した。加えて、健常者とDS患者由来のMGE由来の脳オルガノイドにおけるRNA-seq解析を行ったところ、数個の遺伝子発現に違いが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかん等の脳神経機能異常を示す病態研究において、ヒト脳組織は利用できない。代わりにモデル動物を用いたin vivo研究が行われているが、必ずしもヒトの複雑な病態を反映しているとは言い難い。本研究において、疾患特異的iPS細胞よりDSの病態と関連性のあるMGE0sの作製に成功した。これにより、患者の脳組織を模倣したex vivo病態モデルとして、病態の解明や新たな治療法の開発に向けた、今後のてんかん研究への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, brain organoids in the medial ganglionic eminence (MGE) region containing neural stem cells positive for FOXG1 and NKX2.1 expression were developed from iPS cells derived from Dravet syndrome (DS) patients. The expression of parvalbumin (PV) positive inhibitory neurons was confirmed in brain organoids resembling in medial ganglionic eminence (MGE). It was also confirmed that these PV positive cells were positive for Nav1.1 expression.

研究分野：医師薬学

キーワード：Dravet症候群 発達性てんかん性脳症 SCN1A Nav1.1 疾患特異的iPS細胞 脳オルガノイド 病態モデル GABA作動性神経細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

Dravet 症候群 (DS) は、原因となる遺伝子異常が明確となった数少ない乳児期発症難治性てんかんの一つであり、発作重積等により約 2 割の患者が若年死亡する (Genton ら、2011、Sakaguchi ら、2011)。DS 患者では、主に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネル Na<sub>v</sub>1.1 のサブユニットをコードする *SCN1A* 遺伝子の異常が同定される (Depienne ら、2009、Zuberi ら、2011 他)。SCN1A 遺伝子の変異同定による遺伝子診断は可能だが、詳細な分子病態は未だ不明な点が多く、効果的な治療法が未確立である。平成 27 年には本邦の「難病の患者に対する医療等に関する法律」のもと、厚生労働省の難病政策において指定難病の対象疾患に含まれたことから (厚生労働省健康局長通知：難病に係る診断基準及び重症度分類等について)、早期の病態解明と新たな根治薬および治療法の開発が急務であり、悲願である。

DS モデルマウスを用いた研究より (Han ら、2012、Cheah ら、2012、Martin ら、2010 他) 発達期の前脳 GABA 性介在性神経細胞における Na<sub>v</sub>1.1 のハプロ不全が報告された。これにより中枢神経における GABA 作動性神経細胞を含む神経ネットワークに異常が生じ、脳の抑制性の機能不全により神経細胞の過剰興奮が誘起され、重篤なてんかん発作を発病すると考えられている。しかしながら、モデル動物とヒト脳における神経細胞基盤の違いは周知の通りであり、必ずしも患者の複雑な表現系が推定される病態を反映しているとは言い難い。しかしながら、DS の病態・治療研究には患者の脳組織を利用することはできず、患者由来神経細胞を用いたヒト脳神経の *ex vivo* 疾患モデルが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

DS 患者由来 iPS 細胞より作製した MGE 領域に属する脳オルガノイド (MGEOs) を病態モデルとし、真のてんかんの病態に基づく疾患関連表現型の病態形成機構の解明を目指す。さらには、DS 病態モデル用いた革新的な治療法や予防法の開発に繋がる創薬基盤研究の発展に寄与する。

## 3. 研究の方法

### (1) 疾患特異的 iPS 細胞

SCN1A 遺伝子の Exon26 にナンセンス変異を有する DS 患者由来 iPS 細胞を用いた<sup>1</sup>。DS 患者由来の人工健常コントロールとして、SCN1A の同遺伝子異常を TALEN 法にて修復した iPS 細胞を活用した<sup>2</sup>。

### (2) ヒト iPS 細胞より MGE 由来の脳オルガノイド (MGEOs) の誘導

Birey et al., 2017 および Xiang et al., 2017 の方法を改変し、ヒト iPS 細胞より MGEOs を誘導した<sup>3,4</sup>。

### (3) 免疫組織化学的解析

培養した MGEOs の切片をスライスし、免疫染色法により各種遺伝子マーカーの発現解析を行った。MGE 領域マーカー (Foxg1, Nkx2.1)、神経マーカー (Nestin, BIII-tubulin, GFAP)、興奮性神経マーカー (VGLUT1)、抑制性神経マーカー (VGAT, Parvalbumin)、Na<sub>v</sub>1.1 の抗体を用いた。

#### (4) 活動電位測定

活動電位測定には MEA system ( Maestro, Axion Biosystems ) を活用した。MEA プレート内で MGEOs を培養し、神経の自発的な活動電位を測定した。

#### (5) 遺伝子発現解析

12 週間培養した MGEOs から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス解析により網羅的な遺伝子発現解析を行った。

### 4 . 研究成果

#### (1) ヒト iPS 細胞より MGEOs の作製

本研究では 3 ラインのヒト iPS 細胞 ( 健常者由来 iPS 細胞 : 健常コントロール、DS 患者由来 iPS 細胞 : DS 病態モデル、患者由来人工健常 iPS 細胞 : *SCN1A* 遺伝子異常を修復した DS 病態モデルと isogenic な健常コントロール ) を用いて、MGE 領域に由来する脳オルガノイドを作製した。作製した脳オルガノイドでは、MGE 領域マーカーである FOXG1 および NKX2.1 の発現が陽性な神経幹細胞が観察され、MGE 領域に属する脳オルガノイド ( MGEOs ) であることが確認できた。

#### (2) MGEOs に含まれる神経細胞種の同定

12 週間培養した MGEOs において、BII-tubulin 陽性な神経細胞と GFAP 陽性なアストロサイトの発現が観察された。加えて、神経細胞においては、VGLUT1 陽性なグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞および VGAT 陽性な GABA 作動性の抑制性神経細胞が発現していた。抑制性神経細胞のサブタイプの同定を試みた結果、てんかんの病態に重要な Parvalbumin ( PV ) 陽性な抑制性神経細胞が含まれていることが分かった。また、この PV 陽性な神経細胞では Nav1.1 の発現も認められ、作製した MGEOs が DS の病態モデルとして活用できることが示唆された。

#### (3) MGEOs の活動電位測定

作製した MGEOs の活動電位測定を行った結果、自発的な神経の活動電位を記録することができた。現在、健常者由来 MGEOs と DS 由来 MGEOs で神経ネットワークの発火パターンの際について解析中である。

#### (4) MGEOs の RNA-seq 解析

RNA-seq を用いて健常者由来と DS 由来の MGEOs における遺伝子発現を比較したところ、数種類の遺伝子で発現が変化していることが分かった。現在、これらの遺伝子発現変化が DS の病態形成に關与するか解析中である。

#### <引用文献>

1. N. Higurashi, T. Uchida, C. Lossin, Y. Misumi, Y. Okada, W. Akamatsu, Y. Imaizumi, B. Zhang, K. Nabeshima, M.X. Mori, S. Katsurabayashi, Y. Shirasaka, H. Okano, S. Hirose. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol. Brain*, **6**(19), 2013.
2. Y. Tanaka, T. Sone, N. Higurashi, T. Sakuma, S. Suzuki, M. Ishikawa, T. Yamamoto, J. Mitsui, H. Tsuji, H. Okano and S. Hirose. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from

Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the *SCN1A* gene. *Stem Cell Res.*, **28**, 100-104, 2018.

3. F. Birey, J. Andersen, C.D. Makinson, S. Islam, W. Wei, N. Huber, H.C. Fan, K.R.C. Metzler, G. Panagiotakos, N. Thom, N.A. O'Rourke, L.M. Steinmetz, J.A. Bernstein, J. Hallmayer, J.R. Huguenard, S.P. Pasca. Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, **545**(7652):54-59, 2017.
4. Y. Xiang, Y. Tanaka, B. Patterson, Y.J. Kang, G. Govindaiah, N. Roselaar, B. Cakir, K.Y. Kim, A.P. Lombroso, S.M. Hwang, M. Zhong, E.G. Stanley, A.G. Elefanty, J.R. Naegele, S.H. Lee, S.M. Weissman, I.H. Park. Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell*. **21**(3):383-398.e7.doi: 10.1016/j.stem.2017.07.007., 2017.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirose Shinichi, Tanaka Yasuyoshi, Shibata Mami, Kimura Yuichi, Ishikawa Mitsuru, Higurashi Norimichi, Yamamoto Toshiyuki, Ichise Eisuke, Chiyonobu Tomohiro, Ishii Atsushi	4. 巻 108
2. 論文標題 Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103535 ~ 103535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2020.103535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Yuichi, Tanaka Yasuyoshi, Shirasu Naoto, Yasunaga Shin'ichiro, Higurashi Norimichi, Hirose Shinichi	4. 巻 47
2. 論文標題 Establishment of human induced pluripotent stem cells derived from skin cells of a patient with Dravet syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101857 ~ 101857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yasuyoshi, Higurashi Norimichi, Shirasu Naoto, Yasunaga Shin'ichiro, Moreira Kevin Mello, Okano Hideyuki, Hirose Shinichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Establishment of a human induced stem cell line (FUi002-A) from Dravet syndrome patient carrying heterozygous R1525X mutation in SCN1A gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 11 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2018.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yasuyoshi TANAKA
2. 発表標題 Basic study of pathogenesis of epilepsy by means of iPS cell.
3. 学会等名 the 13th Asian & Oceanian Epilepsy Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Tanaka, M. Ishikawa, N. Higurashi, H. Okano, S. Hirose.
2. 発表標題 Physiological analysis of neurons derived from Dravet syndrome iPSCs models using MEA system.
3. 学会等名 ISDEE2020 Virtual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中泰圭
2. 発表標題 Pathological analysis and drug discovery research for Dravet syndrome using iPSCs model
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Tanaka, M. Ishikawa, N. Higurashi, H. Okano, S. Hirose.
2. 発表標題 Physiological Characterization of neurons derived from Dravet syndrome iPSCs models.
3. 学会等名 The 15th Asian and Oceania Congress of Child Neurology (15th AOCCN). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Tanaka, M. Ishikawa, N. Higurashi, H. Okano, S. Hirose.
2. 発表標題 A MUTATION IN SCN1A SELECTIVELY IMPAIRS IPSCS-DERIVED INHIBITORY NEURONS DERIVED FROM A PATIENT WITH DRAVET SYNDROME.
3. 学会等名 The International Society of Stem Cell Research 2019 Annual Meeting (ISSCR 2019). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中泰圭, 石川充, 日暮憲道, 岡野栄之, 廣瀬伸一.
2. 発表標題 MEAシステムを用いたDravet症候群患者iPS細胞由来神経細胞の機能解析.
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中泰圭, モレイラ ケビン, 廣瀬伸一.
2. 発表標題 Scn1a KOマウス海馬由来抑制性神経細胞の機能解析.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学学会・第62回日本神経化学会大会合同大会).
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Moreira, Y. Tanaka, S. Hirose.
2. 発表標題 In-Vitro Hippocampal Inhibitory Neuronal activity of SCN1A KO Mice and a Potential Alternative Treatment Path.
3. 学会等名 the American Epilepsy Society annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------